

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

化学物質の動物個体レベルの免疫毒性データ集積とそれに基づくMulti-ImmunoTox assay (MITA) による予測性試験法の確立と国際標準化(H30-化学-一般-001)

分担研究報告書

MITAの国際標準化へ向けてのvalidation試験

研究分担者 山影康次 一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所

研究要旨

Multi-ImmunoTox assay (MITA) は、T細胞および単球のサイトカイン転写調節に及ぼす化学物質の影響をレポーター遺伝子の発光を利用して評価する免疫毒性評価試験法である。

MITAのOECDガイドライン化を目指し、T細胞におけるIL-2 転写活性抑制を指標とする免疫毒性物質評価系の国際バリデーション試験が終了したことから、今年度から、単球におけるIL-1 転写活性抑制を指標とする免疫毒性物質評価系の国際バリデーション試験を開始した。

フェーズ0として、技術移転性を確認するために、3試験施設がプロトコル(ver. 007E)に従って3物質の実験を行った。その結果、Dapsoneと*p*-Nitroanilineは3試験施設の結果が一致したが、Diethanolamineの我々の結果は他の2試験施設と一致しなかった。不一致の原因を調査した結果、化学物質処理1時間後に実施するIL-1 転写活性剤(LPS)添加後の攪拌の有無が秦野研究所とリードラボ(東北大学)との違いであることが判明した。その他の操作上の差異を確認するために、秦野研究所と東北大学のそれぞれの担当者が秦野研究所において同時に試験を実施した。その結果、結果に影響するような操作上の差異は認められず、フェーズ0で使用した3物質の結果もほぼ一致した。また、LPS添加後の攪拌を実施してDiethanolamineの3回の繰り返し実験を行なった結果、すべて一致した結果が得られ、他の2試験施設の結果とも一致することを確認した。さらに、その影響を検討した結果、LPS添加後に攪拌しない場合には結果が安定せず、攪拌することによって安定した結果が得られることが明らかとなった。

以上の結果より、フェーズ0における結果の不一致は、プロトコルの記述に起因して発生したLPS添加後の攪拌操作の差異が主要因であり、それを改善することにより、良好な施設内再現性および施設間再現性が得られると考えられる。

キーワード：レポーターアッセイ、IL-1 プロモーター活性、バリデーション試験、技術移転性、LPS

A . 研究目的

MITAの開発者である相場らは、IL-2 転写調節障害を key event とする T 細胞分化異常誘導に関する AOP を作成した。それに基づき、MITA を構成する IL-2 転写活性抑制を指標とした T 細胞分化異常誘導化学物質評価系の OECD テストガイドライン化を目指し、国際バリデーション試験を実施し、昨年度終了した。

また、相場らは、60 種類の化学物質を MITA の複数項目に関して効果発現最低濃度 (Lowest observed effect level ; LOEL) を基にクラスター分類することにより、化学物質が 6 種類のクラスターに分類できることを明らかにした。

このクラスター分類は、既に OECD テストガイドライン (442E) に承認されている皮膚感作性試験 (IL-8 Luc assay) に加え、MITA を構成する IL-2 転写活性抑制評価系と IL-1 転写活性抑制評価系の結果に基づいて行われる。そこで、MITA を構成する IL-1 転写活性抑制評価系を OECD テストガイドライン化するために、その国際バリデーション試験が開始された。

今年度は、フェーズ 0 として、IL-1 転写活性抑制作用が知られている 3 物質を用いて、3 試験施設による技術移転性を確認した。

B . 研究方法

B-1) 使用した細胞

IL-1 転写活性抑制試験には、IL-1 および G3PDH の各プロモーター領域にそれぞれ緑色ルシフェラーゼ遺伝子 (SLG) および赤色ルシフェラーゼ遺伝子 (SLR) を繋ぎ、それらの遺伝子を挿入したヒト人工染色体 (HAC) ベクターをヒト急性単球性白血病由来の THP-1 細胞に導入した安定細胞株 THP-G1b (TGCHAC-A4) を使用した。

細胞の解凍および継代には C 培地、即ち、非働化した仔ウシ胎児血清 (FCS、ロット番号 : 715004、Biological Industries) を 10 vol%、および抗生物質-抗真菌剤混合溶液 (GIBCO) を 1 倍となるように添加した RPMI-1640 (GIBCO) を使用した。

試験には、非働化 FCS を 10 vol% 添加した RPMI-1640、即ち、B 培地を使用した。

なお、FCS の非働化は 56 で 30 分保温して行い、そのまま室温に放置したのち、冷

蔵保存した。

B-2) 使用した試薬

技術移転性を確認するために、Dapsone、Diethanolamine、*p*-Nitroaniline の 3 物質が国立医薬品食品衛生研究所または東北大学から送付され、それらを試験に使用した。

また、陽性対照物質として東北大学から送付された Dexamethasone (DEX、富士フィルム和光純薬株式会社) の 100 mg/mL 溶液 (凍結保存) を使用した。

溶媒として、蒸留水またはジメチルスルホキシド (DMSO) を使用した。

IL-1 の活性化剤として、東北大学から送付された大腸菌 K12 株由来の Lipopolysaccharide (LPS、InvivoGen) の 1 mg/mL 溶液 (凍結保存) を使用した。

発光試薬としては、Tripluc® Luciferase assay reagent (東洋紡株式会社) を使用した。

B-3) 研究方法

IL-1 転写活性抑制試験は、リードラボ (東北大学) の指示により、解凍時の培養液を A 培地 (Puromycin および Blastidicin S HCl を添加) から C 培地に変更したこと、発光測定装置のフィルターを F1 から F2 に変更したこと、実験回数を 1 セット 3 回の 2 セットとしたこと以外は、MITA プロトコル (Ver.007E) に従って行った。概要は以下の通りである。

2×10^6 細胞/mL の THP-G1b (TGCHAC-A4) 細胞懸濁液を調製し、その 50 μ L を 96 well プレートの各ウェルに播種 (1×10^5 細胞/ウェル) した。また、溶解性検討結果から、プロトコルに従い、Dapsone では DMSO、Diethanolamine では蒸留水、*p*-Nitroaniline では DMSO を使用し、それぞれ 250 mg/mL、100 mg/mL および 500 mg/mL の原液を調製した。さらに、原液を溶媒で段階希釈 (公比 2) して 10 濃度の化学物質調製液を調製した。なお、溶解性は、15,000 rpm で 5 分間遠心し、沈澱の有無を確認することにより判定した。

調製した化学物質調製液を B 培地に添加 (蒸留水の場合は 25 倍希釈、DMSO の場合は 10 倍希釈後さらに 5 倍希釈) して 2 倍濃度の処理液を調製し、その 50 μ L を細胞懸濁液 (50 μ L) が入っている各ウェルに添加し、

プレートシェーカーで約 30 秒振盪した(溶媒の最終濃度:蒸留水は 2 vol%, DMSOは 0.1 vol%)。処理開始 1 時間後に 1 µg/mLのLPSをウェルあたり 10 µL添加し、約 30 秒プレートシェーカーで振盪することにより活性化処理を行った。6 時間培養(37 °C、5%CO₂)後にTripluc® Luciferase assay reagentを各ウェルあたり 100 µL添加し、10 分間プレートシェーカーで振盪後、発光測定装置(AB-2350、フェリオス、アトー社製)でフィルターのない発光量(F0)とF2フィルターをセットしたときの発光量をそれぞれ 3 秒間測定した。その測定値をデータシート「Data sheet for MITA THP-G1b (TGCHAC-A4) Ver. 008 20181203」に入力して、LPSを添加しない細胞に対するLPSを添加した細胞の標準化IL-1 転写活性の増加率(FInSRG-LA)および化学物質処理した細胞における標準化IL-1 転写活性の抑制率(%suppression)を求めた。

C. 研究結果

C-1) フェーズ 0

各物質について、実験日または継代後の日数を変えて、実験を繰り返し、3 実験を 1 セットとし、2 セットの実験(計 6 回の実験)を行った。

Dapsoneのセット 1 では、すべての実験で 15.6 µg/mLから濃度依存的に発光量の減少、即ち、IL-1 の転写活性抑制が認められた(図 1)。セット 2 では、実験 1 および 2 では明らかに濃度依存的にIL-1 の転写活性抑制が認められた。一方、実験 3 ではバラツキが大きく、高濃度でIL-1 の転写活性抑制が認められたが、濃度依存性は明確ではなかった(図 2)。

Diethanolamineのセット 1 では、弱い転写活性抑制と高濃度での転写活性促進(実験 1)、低濃度と高濃度での転写活性促進(実験 2)、濃度依存的な転写活性抑制(実験 3)が認められ、再現性のある結果が得られなかった(図 3)。セット 2 では、62.5 µg/mLないし 125 µg/mLから濃度依存的に転写活性抑制が認められ、1000 µg/mLないし 2000 µg/mLで転写活性抑制作用の低下または転写活性促進作用を示すような類似の反応性を示した(図 4)。

p-Nitroanilineのセット 1 の実験では、いずれも 15.6 µg/mLから濃度依存的に転写

活性抑制が認められ、500 µg/mLでその作用が低下した(図 5)。セット 2 の実験においても同様の結果が得られた(図 6)。

フェーズ 0 の 3 試験施設の結果と比較した結果(表 1)、Dapsoneとp-Nitroanilineは 3 試験施設ともに転写活性抑制作用を示し、一致した結果が得られた。一方、Diethanolamineについては、2 試験施設では転写活性抑制作用を示し、我々の結果で得られたような明らかな転写活性促進は認められなかった。

C-2) LPS添加方法の影響

この試験系は化学物質で処理し、1 時間経過後にIL-1 の転写活性を誘導するためにLPSを添加する。プロトコルでは、「One hour after the addition of chemicals, add 10 µL of control or 1000 ng/mL LPS solution to the cells (#C1-#F1 or #C2-#F12, respectively) using an 8 channel or 12 channel pipetman after pipetting 20 times. Make sure that the apex of the tip is dipped into the medium.」と記載されており、我々は、「LPS溶液を 20 回ピペッティングしたのち、10 µLのLPS溶液をサンプリングし、それを培養液にチップを確実に浸けた状態で添加する」と解釈した。FInSRG-LAは、蒸留水を 10 µL添加したウェルの標準化発光量に対して、LPSを 10 µL添加したウェルの標準化発光量の比で求められることから、LPS添加の影響は大きいと考えられた。そこで、化学物質の代わりにDMSOを添加して 1 時間培養したのち、我々のLPS添加方法、即ち、10 µLを静かに添加する「添加のみ群」、添加してチップをウェル内で回転して攪拌する「回転群」およびウェル内でピペッティングにより攪拌する「ピペッティング群」を設定してLPS添加 6 時間後の発光量を測定した。なお、LPS添加後のプレートシェーカーによる攪拌は実施しなかった。その結果、攪拌した群のFInSLG-LAは「添加のみ群」よりも高い値、即ち、IL-1 の転写活性促進を示す結果が得られた(図 7)。また、この傾向にFCSの差(秦野研究所または東北大学で非働化した同一ロットのFCS、ならびに、MITA用ではなく、かつ、非働化していないFCS)は認められなかった(図 7)。

リードラボにLPS添加方法に関するプロ

トコルの記載について確認したところ、プロトコルの記載は、「チップを培地につけた状態でLPSを 10 μ L 添加し、その後 20 回ピペティングする」であることが明らかとなった。そこで、秦野研究所で非働化したFCSを用いてLPSの添加方法の差による影響について更に検討した。8 連のピペットで細胞を播種し、必要なすべてのウェルにDMSOを添加した。1 時間培養後、DMSOコントロール（2 列目）に相当する上段 4 ウェルはLPS添加のみ実施（ピペティング無し）し、その下段 4 ウェルはLPS添加後 20 回ピペティングし、3 列目以降は 8 連ピペットでLPS添加操作を行った（図 8）。その結果を表 2 にまとめた。すべてDMSO処理群であるが、LPS添加のみ（ピペティング無し）をコントロールにした場合、ピペティング無しの条件であっても、転写活性抑制結果になることや、20 回ピペティングでは転写活性促進の結果になることもあり、その傾向は、LPS添加後にプレートを撪拌しない場合にはさらに強く表れた（図 8）。また、20 回ピペティングをコントロールとした場合には、同じ 20 回ピペティングしたウェルでは%suppressionに差は認められなかったが、ピペティング無しまたは 1 回の場合には、転写活性抑制の結果が得られ、プレートを撪拌しない場合にはその傾向は強く表れた（図 8）。

LPSの添加方法以外の操作上の差異を確認するために、秦野研究所においてリードラボの担当者が秦野研究所の担当者の実験操作を観察した。観察は、LPS添加後に撪拌する方法に変更してフェーズ 0 の 3 物質の実験について実施した。それと同時にリードラボの担当者もフェーズ 0 の 3 物質の実験を実施した。その結果、操作上の差異は認められず、3 物質の結果はいずれもほぼ同じ反応が得られた（図 9）。そこで、改善したLPS添加法でDiethanolamineの再試験（3 実験、1 セット）を実施した。その結果、すべての実験において 31.3 μ g/mL から濃度依存的に転写活性抑制が強くなり、1000 μ g/mL および 2000 μ g/mL でその作用が低下する反応を示し、再現性が得られた（図 10）。

C-3) 血清の影響

DEX（25、50、100 μ g/mL）を用いてFCSの影響を検討した。その結果、継代時の細

胞密度をプロトコルに記載されている範囲、即ち、 2×10^5 細胞/mL と 5×10^5 細胞/mL とし、2 種類のFCS（秦野研究所で非働化したFCSと東北大学で非働化したFCS）で培養し、継代 3 日後の細胞を用いて、1 枚のプレートでDEXの反応性を比較した（図 11）。その結果、 2×10^5 細胞/mL で継代した場合、東北大学で非働化したFCSの方がやや転写活性抑制が強く、 5×10^5 細胞/mL の場合も東北大学のFCSで転写活性抑制作用がやや高い傾向があるが、ほぼ同じ反応性を示した（図 11）。

C-4) 継代時細胞密度と培養日数の影響

秦野研究所で非働化したFCSを用いて継代日数の異なる細胞を 1 枚のプレートに播種し、DEXの反応性を比較した（図 12）。DEXは、継代 3 日後に播種して実験した場合には 40~60%の転写活性抑制作用を示した。一方、継代 4 日後の場合、 2×10^5 細胞/mL で継代した細胞は継代 3 日後の細胞と同様の反応性を示したが、 5×10^5 細胞/mL で継代した細胞では 40%未満の転写活性抑制を示した（図 12）。再現性を確認した結果、 5×10^5 細胞/mL で継代し、継代 4 日後の細胞で実験した場合、DEXの反応性低下が再現された（図 13）。

C-5) 細胞増殖率

今回の試験に使用したFCSは、指定された同一ロットのFCSを各施設で非働化して使用したが、非働化方法の詳細はプロトコルに記載されていない。そこで、秦野研究所で使用している非働化FCSと東北大学で非働化したFCS、MITA用ではなく、かつロットの異なる非働化していないFCSで培養した細胞の増殖率を求めた。その結果、 2×10^5 細胞/mL で継代した場合、倍加時間はいずれのFCSもほぼ 34 時間であり、ロット差、非働化による差は認められなかった。また、 5×10^5 細胞/mL で継代した場合、播種後 4 日目では対数増殖期が終了し定常期にあると考えられた（図 14）。

D . 考察

フェーズ 0 では、1 物質について 6 回（3 回/セット \times 2 セット）の実験を行なったが、*p*-Nitroanilineでは濃度依存性および最終判定ともに再現性のある結果が得られ、他の 2 試験施設の最終判定とも一致し、施設

間再現性が得られた。Dapsoneについては、高濃度での反応性に差が認められたが、5回の実験の判定は一致した。残り1回の実験結果は、転写活性促進を示す濃度が存在し、バラツキも大きかったが、判定は一致しており、他の2試験施設の最終判定とも一致した。Diethanolamineでは、転写活性抑制のみを示した実験が2回、転写活性抑制と転写活性促進の両方の反応を示した実験が3回、転写活性促進のみを示した実験が1回となり、再現性が得られなかった。他の2試験施設では単発的に転写活性促進を示す濃度が存在するものの、判定はすべて転写活性抑制であり、我々の結果のみ施設間再現性なしとなった。

Diethanolamineの結果が、他の試験施設と明らかに異なることから、その原因を特定するために検討実験を行なった。

フェーズ0における我々の結果では、コントロールのFInSRG-LA (LPSを添加しない細胞に対するLPS添加による標準化IL-1転写活性の増加率)が他の施設と比較して低いことから、これがバラツキの原因の一つとして議論された。我々は、「チップを培養液につけた状態で(攪拌せずに)LPSを添加する」とプロトコル(Ver.007)を解釈していたが、LPSの添加方法が重要であると考えたことから、LPS添加後の攪拌の影響を検討した。その結果、LPS添加後に攪拌することによって、転写活性促進様の結果が得られることが明らかとなり、フェーズ0のDiethanolamineで認められた転写活性促進結果の原因となった可能性が示唆された。さらに、%suppressionの溶媒対照となるLPS添加コントロールのLPS添加後の攪拌条件が転写活性に影響することが明らかとなった。即ち、化学物質の代わりにDMSOを使用した場合、すべての処理群が理論的には同じ転写活性、即ち、%suppressionに差の無い結果となることが期待される。しかしながら、LPS添加後に攪拌しないコントロールの場合、攪拌条件にかかわらず結果が一致せず、安定した結果が得られなかった。一方、20回攪拌したコントロールの場合では、同じ条件、即ち20回攪拌した群では期待通り%suppressionに差は認められないが、攪拌しない群では結果が一致しなかった。LPS添加後にプレートを手を攪拌しない場合には、これらの傾向が明確となった。特に、20回

攪拌したコントロールの場合では、20回攪拌しない群ではすべて明らかな転写活性抑制を示す結果となった。この結果は、LPS添加後のプレートシェーカーによる攪拌のみでは、LPSを十分に作用させることができないことを示唆している。また、プロトコルでは、LPS添加後のプレートシェーカーによる攪拌条件が細かく規定されていない。これらのことから、我々がフェーズ0で実施したLPS添加後にピペティングによる攪拌をしない条件下では、LPS添加後のプレートの攪拌状態が結果のバラツキに影響した可能性も考えられる。

この試験系で安定した結果を得るために、LPS添加後の攪拌が重要であることを支持する結果として、LPS添加後に攪拌して実施したリードラボとの比較実験の結果に差はなく、その後に実施したDiethanolamineの結果もフェーズ0で認められた転写活性促進を示す結果は得られず、他の2試験施設と同じく、転写活性抑制のみを示す結果が再現良く得られたことがあげられる。

フェーズ0の結果の不一致の原因として、FCSの非働化の差が影響した可能性も考えられたことから、FCSによる影響をLPS添加法の比較実験(図7)および継代細胞密度と培養日数の影響の検討実験(図11)によって検証した。LPS添加比較実験ではFCSの違いによる明確な差は認められず、継代細胞密度と培養日数の検討実験では東北大学のFCSで良好な反応を示す傾向が認められたが、明らかな差とは考えられなかった。

また、継代後の培養日数がLPSによる転写活性化に影響している可能性についても検討した。継代細胞密度をプロトコル記載の最低とし、プロトコル記載の最大日数である4日間培養してDEX処理による反応性を調べた結果、転写活性抑制作用は40~60%の範囲内の値を示した。一方、継代細胞密度をプロトコル記載の最大である 5×10^5 細胞/mLとし、最大日数培養してDEX処理した場合、転写活性抑制作用は40%未満となり、再現性も得られた。細胞増殖率の結果は、 5×10^5 細胞/mLで継代した場合、培養4日後では細胞密度が 2×10^6 細胞/mLに達し、細胞増殖が止まる定常状態であることを示したことから、この状態では、IL-1の転写活性が低下するとともに化学物質に対する反応性も低下する可能性が考えられた。

E. 結論

MITAの技術移転性を評価するためにフェーズ0として既知の3物質について実験したが、1物質(Diethanolamine)で再現性が得られず、他の2試験施設の結果とも一致しなかった。そこで、その原因を検討した結果、MITAプロトコル(Ver.007)に記載されているLPSの添加法の解釈が他の試験施設と異なっていたことが原因であり、改善した方法でリードラボと同時に技術確認実験を実施したところ、同等の結果が得られたほか、追加で実施したDiethanolamineの3回繰り返し実験では、良好な再現性が得られ、また、他の2試験施設と同様の結果であった。以上のことから、プロトコルのLPS添加法の記載を修正することによっ

て、MITAは良好な施設内再現性および施設間再現性が得られると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

- 1) 木村 裕、安野 理恵、渡辺 美香、小林 美和子、岩城 知子、藤村 千鶴、近江谷 克裕、山影 康次、中島 芳浩、小林 眞弓、大森 崇、足利 太可雄、小島 肇、相場 節也:Multi-ImmunoTox Assay (MITA) バリデーション研究の結果 日本動物実験代替法学会 第31回大会(熊本)2018年11月

表1 フェーズ0における3物質(3実験/セット、2セット)の結果

IL-1β Phase0 Result(35%)						2018/10/5	
Chemical	Lab.A (Lead Lab)	Lab.B (AISTTS)	Lab.C (FDSC)	Lab.D (AISTTA)	concordance	Based on Majority	
Dapson Set1	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S	
Dapson Set2	S:NSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S	
Diethanolamine Set1	S:SSS	S:SSS	?:NAS	S:SSS	0	S	
Diethanolamine Set2	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SNS	1	S	
p-Nitroaniline Set1	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S	
p-Nitroaniline Set2	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S	

Between
83.33%

IL-1β Phase0 Result(20%)						2018/10/5	
Chemical	Lab.A (Lead Lab)	Lab.B (AISTTS)	Lab.C (FDSC)	Lab.D (AISTTA)	concordance	Based on Majority	
Dapson Set1	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S	
Dapson Set2	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S	
Diethanolamine Set1	S:SSS	S:SSS	S:SAS	S:SSS	1	S	
Diethanolamine Set2	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S	
p-Nitroaniline Set1	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S	
p-Nitroaniline Set2	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S	

Between
100%

IL-1β Phase0 Result(25%)						2018/10/5	
Chemical	Lab.A (Lead Lab)	Lab.B (AISTTS)	Lab.C (FDSC)	Lab.D (AISTTA)	concordance	Based on Majority	
Dapson Set1	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S	
Dapson Set2	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S	
Diethanolamine Set1	S:SSS	S:SSS	S:SAS	S:SSS	1	S	
Diethanolamine Set2	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S	
p-Nitroaniline Set1	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S	
p-Nitroaniline Set2	S:SSS	S:SSS	S:SSS	S:SSS	1	S	

Between
100%

: Suppression, N: No response, A: Augmentation

S

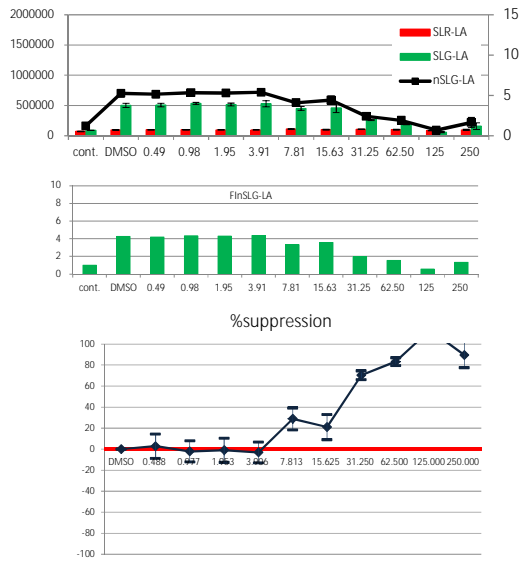
表2 LPS添加後のピペティングの有無による IL-1 転写活性への影響のまとめ

Plate No.	Pipetting in Control (Row 2)	Shaking of a plate	Fold Increase (P: Significance, N: Not significance)				
			Control (Row 2)	No. of times of pipetting			
				0 (Row 3)	0 (Row 6)	1 (Row 4)	20 (Row 5)
1	No	Yes	7	7 (N)	7 (N)	7 (N)	8 (P)
3	No	Yes	13	11 (P)	11 (P)	13 (N)	13 (N)
2	No	No	8	8 (N)	6 (P)	7 (N)	11 (P)
1	Yes	Yes	8	9 (N)	7 (N)	8 (N)	8 (N)
3	Yes	Yes	10	9 (P)	8 (P)	9 (P)	9 (N)
2	Yes	No	11	7 (P)	6 (P)	7 (P)	10 (N)

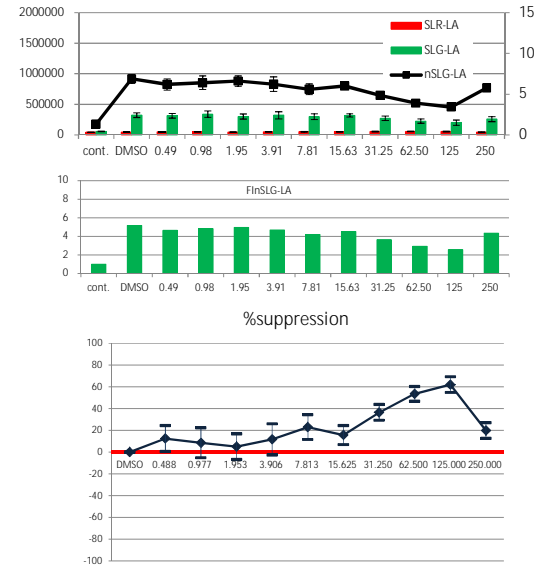
コントロールのピペティングは20回実施した。

Set 1

(1st Experiment)



(2nd Experiment)



(3rd Experiment)

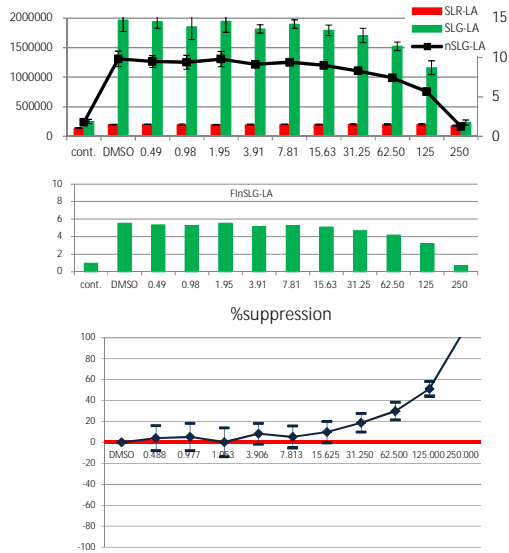
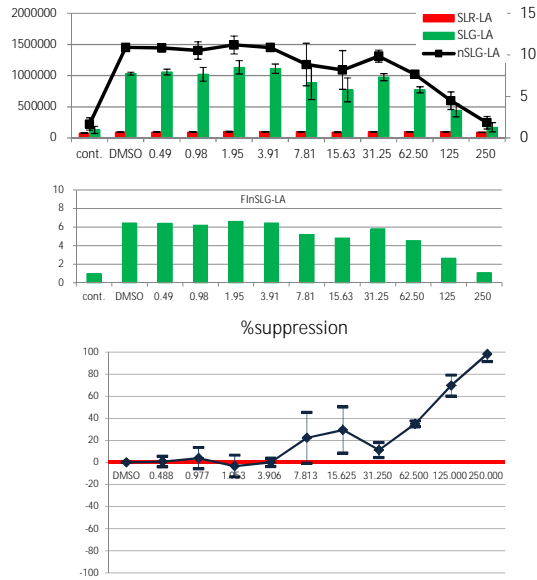


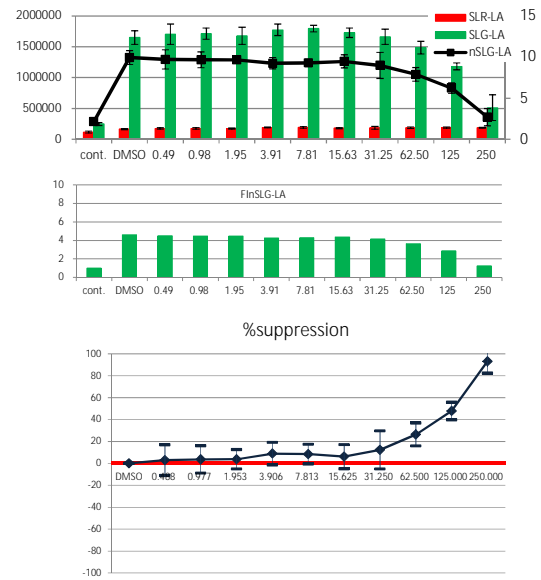
図1 Dapsone の IL-1 転写活性抑制試験の結果 (Phase 0, Set 1)

Set 2

(1st Experiment)



(2nd Experiment)



(3rd Experiment)

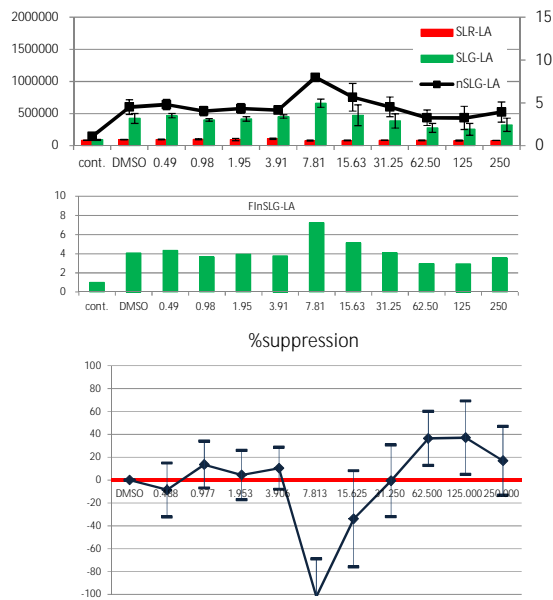
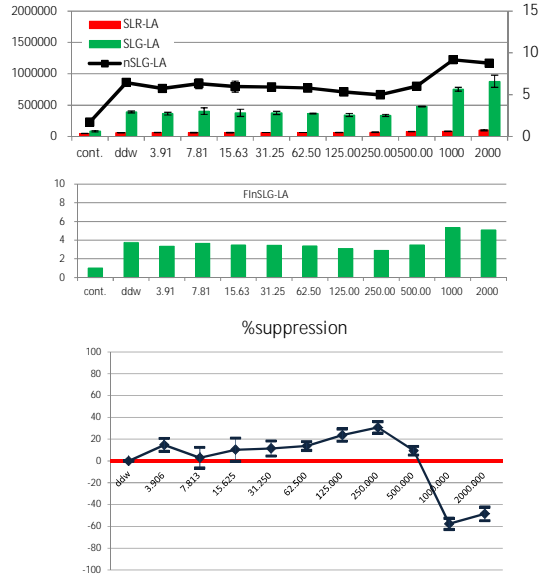


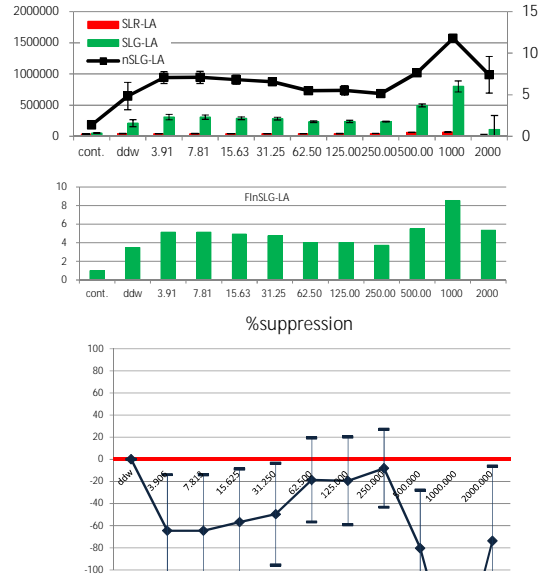
図2 Dapstone の IL-1 転写活性抑制試験の結果 (Phase 0, Set 2)

Set 1

(1st Experiment)



(2nd Experiment)



(3rd Experiment)

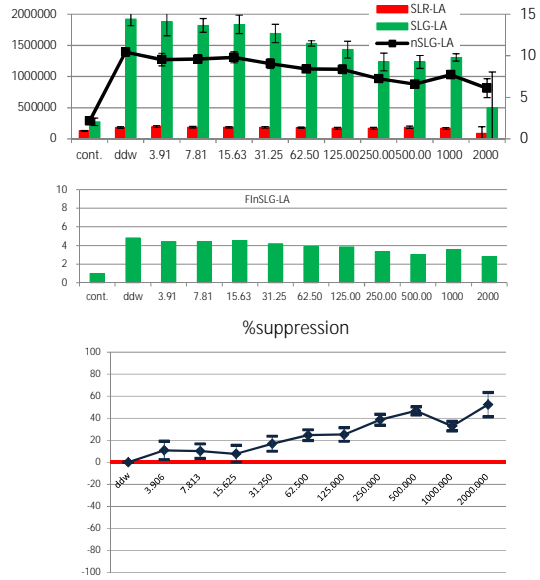
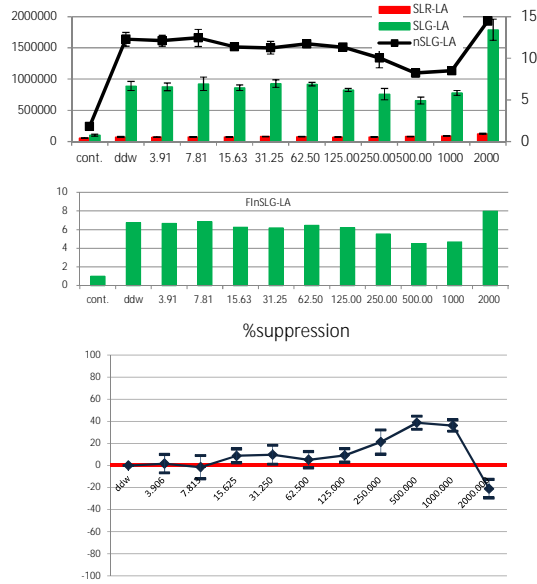


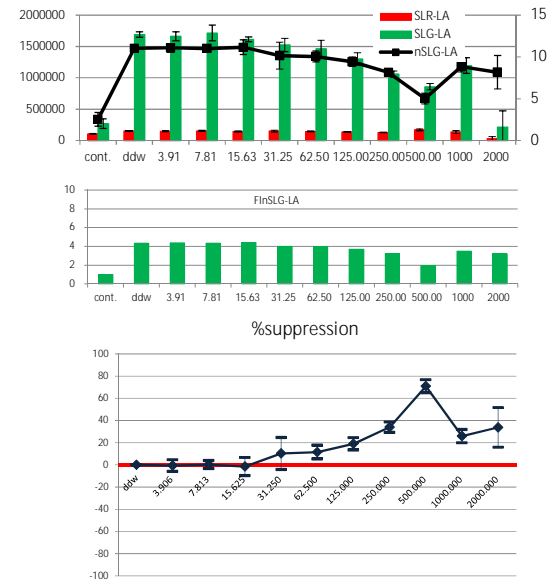
図3 Diethanolamine の IL-1 転写活性抑制試験の結果 (Phase 0, Set 1)

Set 2

(1st Experiment)



(2nd Experiment)



(3rd Experiment)

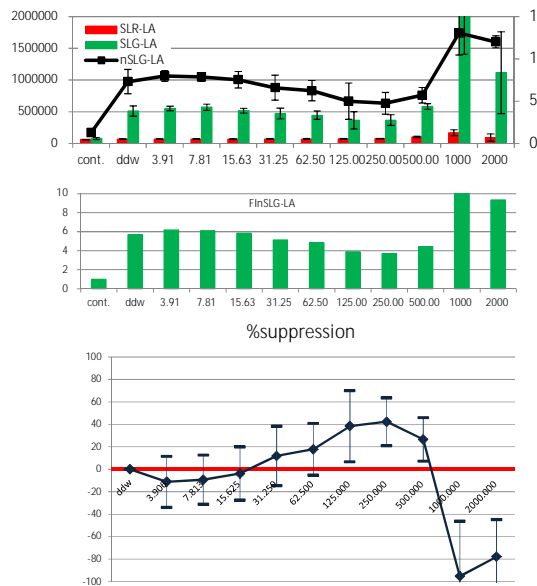
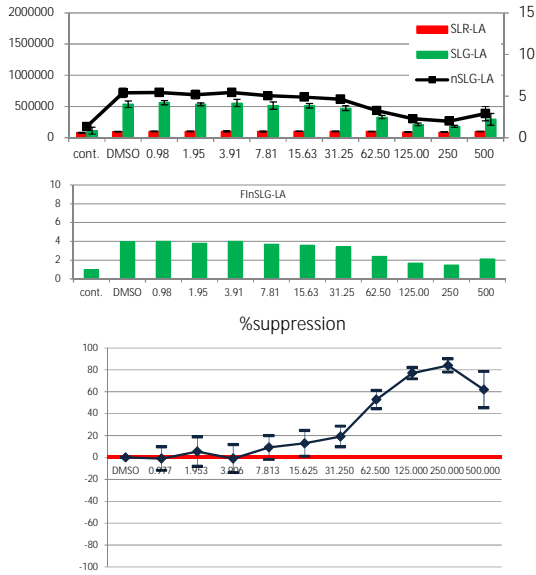


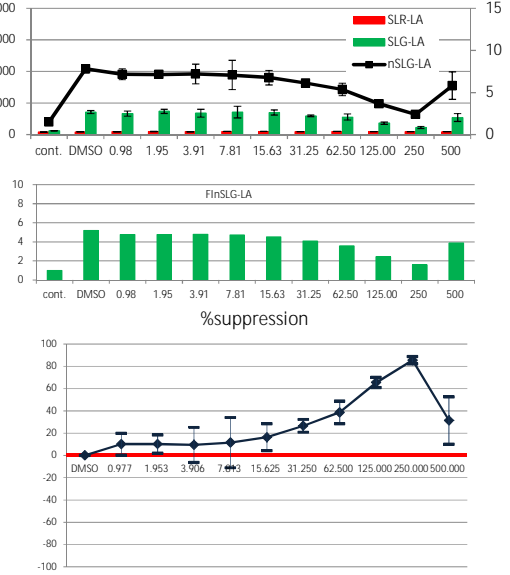
図4 Diethanolamine の IL-1 転写活性抑制試験の結果 (Phase 0, Set 2)

Set 1

(1st Experiment)



(2nd Experiment)



(3rd Experiment)

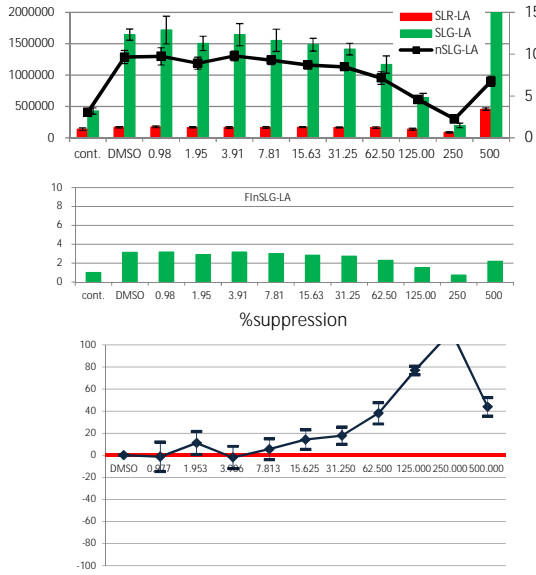
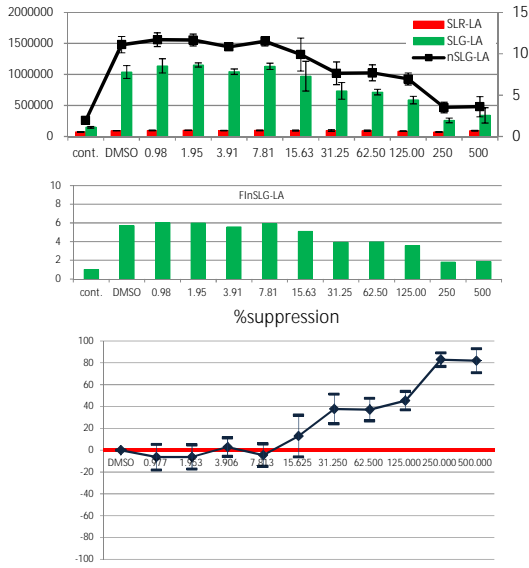


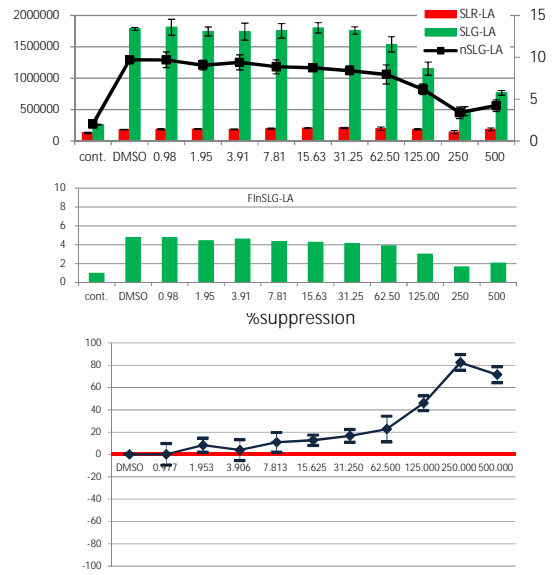
図5 *p*-Nitroaniline の IL-1 転写活性抑制試験の結果 (Phase 0, Set 1)

Set 2

(1st Experiment)



(2nd Experiment)



(3rd Experiment)

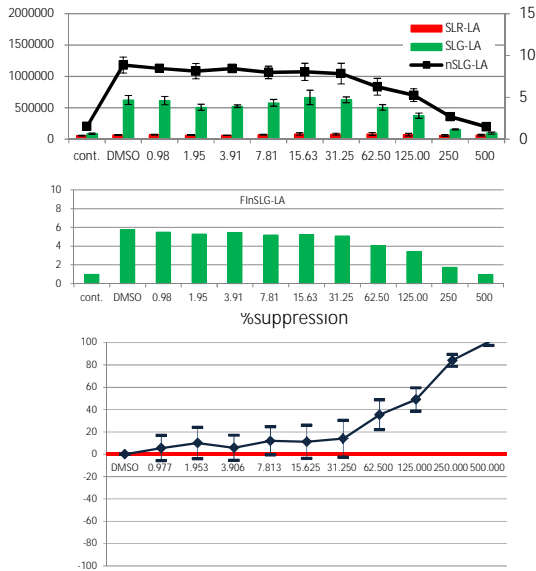
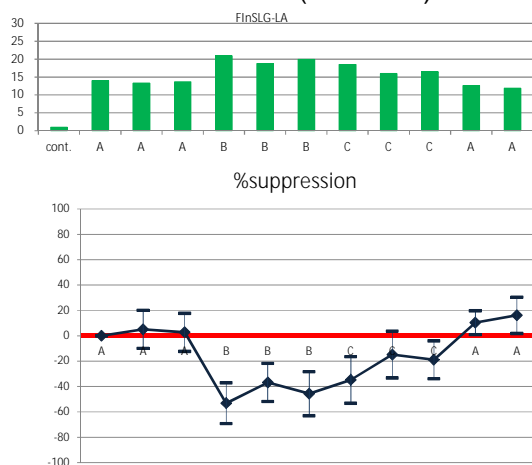
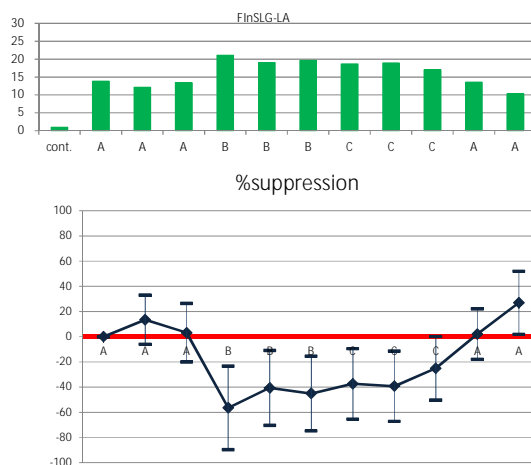


図6 *p*-Nitroaniline の IL-1 転写活性抑制試験結果 (Phase 0, Set 2)

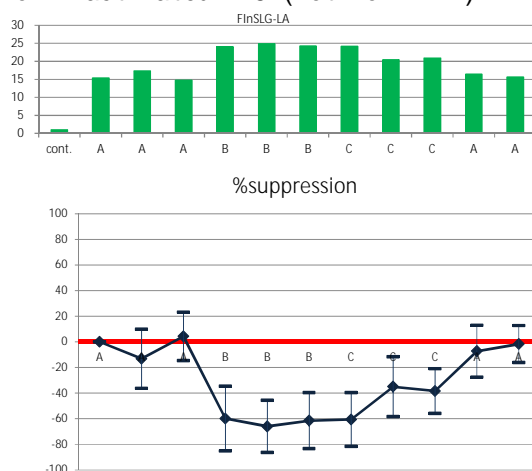
Heat-inactivated FBS (for MITA)



Heat-inactivated FBS from Tohiku Univ.



Non-inactivated FBS (not for MITA)



- A: LPS was added to each well without mixing according to the protocol.
- B: LPS was added to each well and it was mixed by circulation of a tip in each well.
- C: LPS was added to each well and it was mixed by pipetting.

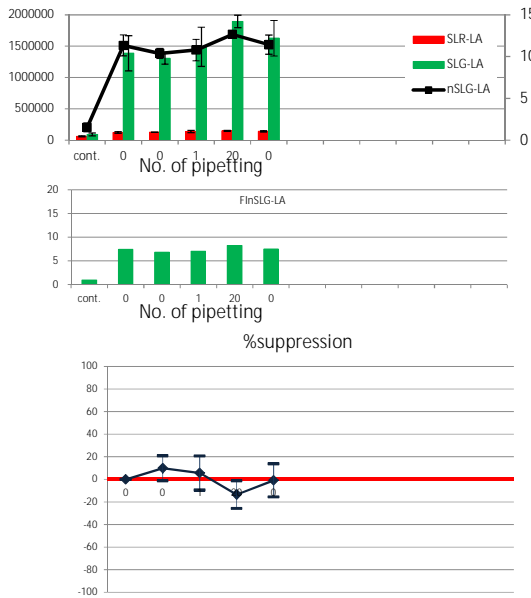
図7 LPS添加後の攪拌がIL-1 転写活性に及ぼす影響

Plate Layout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control (without LPS) LPS, 20 times pipetting LPS, no pipetting LPS, 1 time pipetting LPS, 20 times pipetting LPS, no pipetting											
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Plate 1 (Shaking)

Row 2 : No pipetting



Row 2 : 20 times pipetting

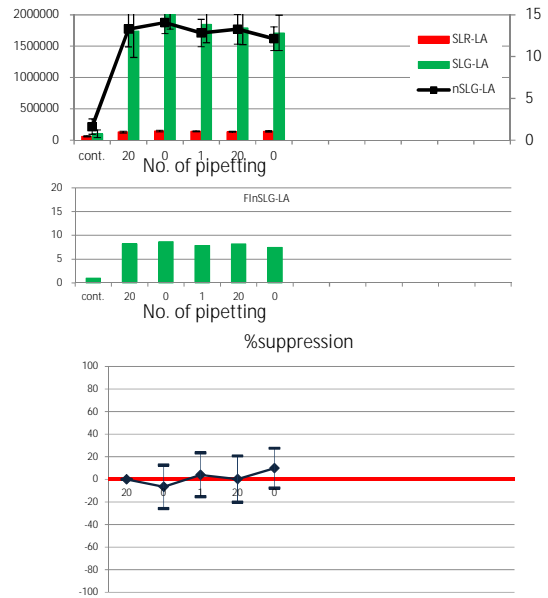
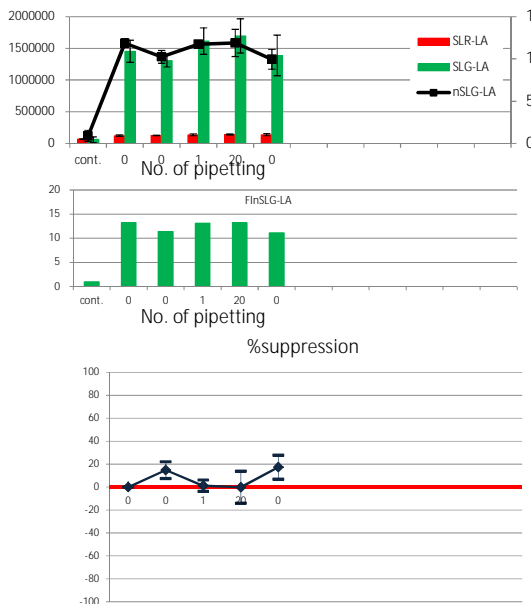


Plate 2 (Shaking, Reproducibility on the same day)

Row 2 : No pipetting



Row 2 : 20 times pipetting

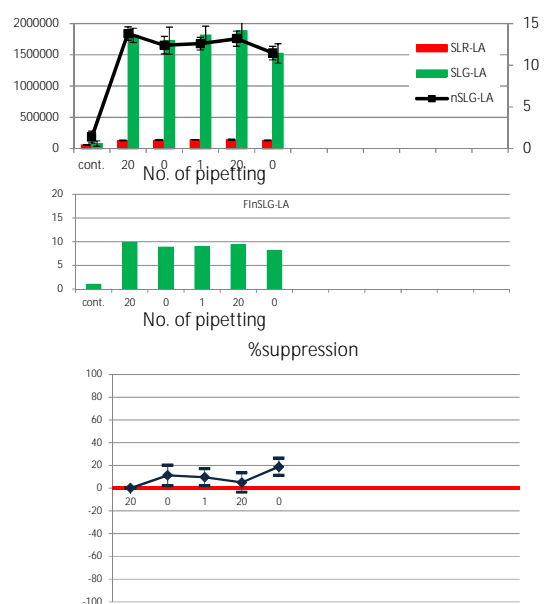
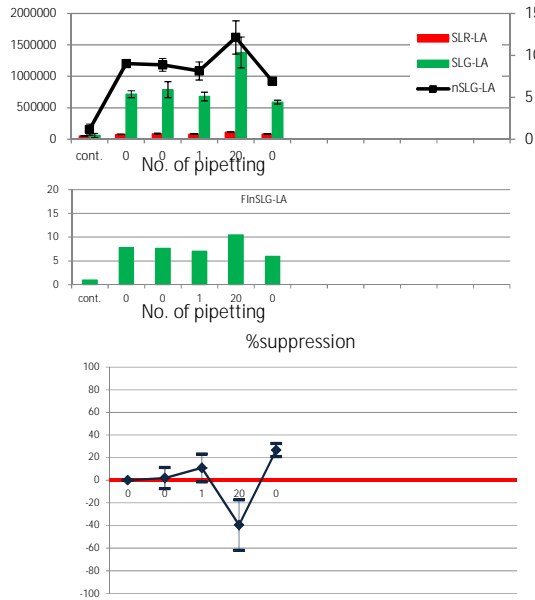


図 8 LPS 添加後のピペッティングの有無による IL-1 転写活性への影響

Plate 3 (No shaking)

Row 2: No pipetting



Row 2: 20 times pipetting

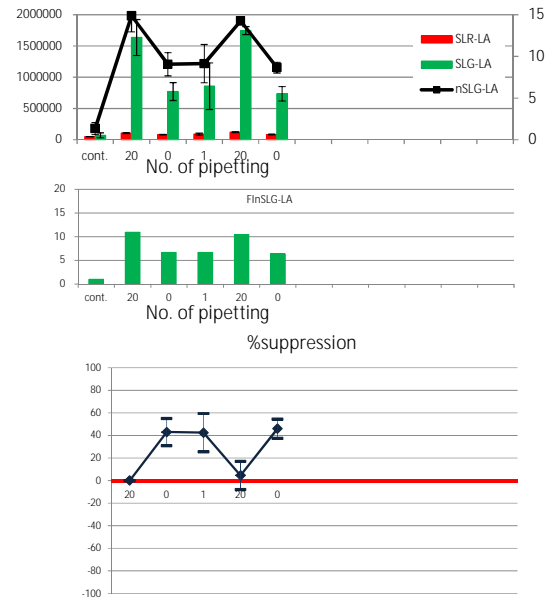
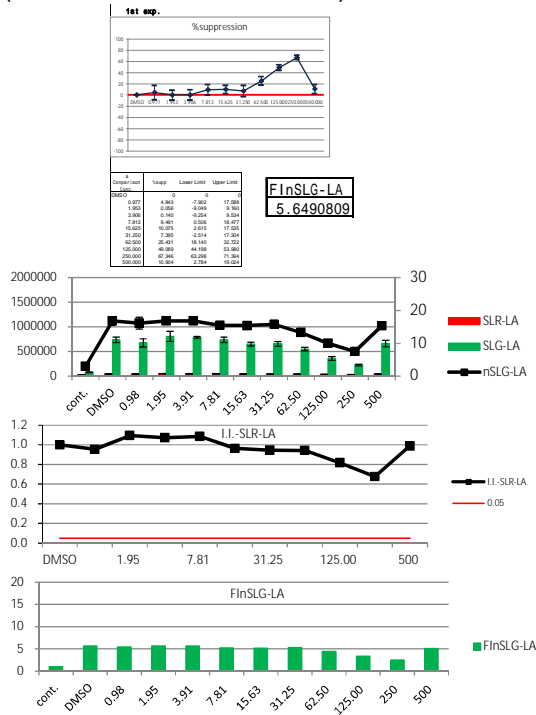


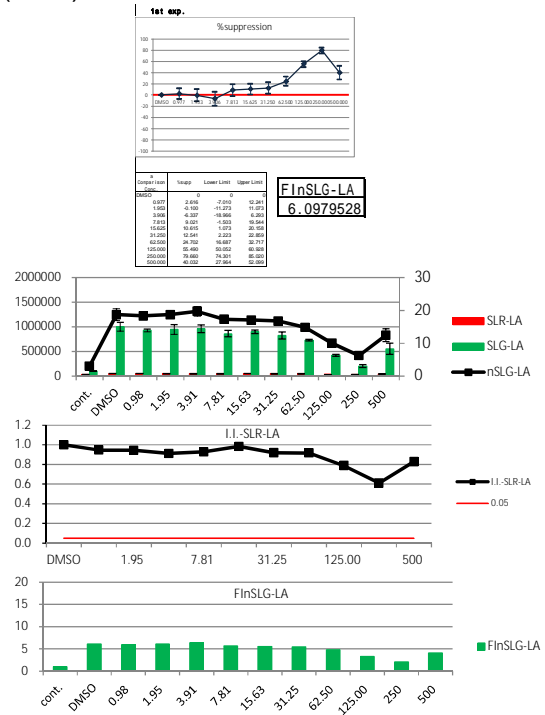
図 8 LPS 添加後のピペッティングの有無による IL-1 転写活性への影響 (続き)

Dapstone

(Lead Lab.: Tohoku Univ.)

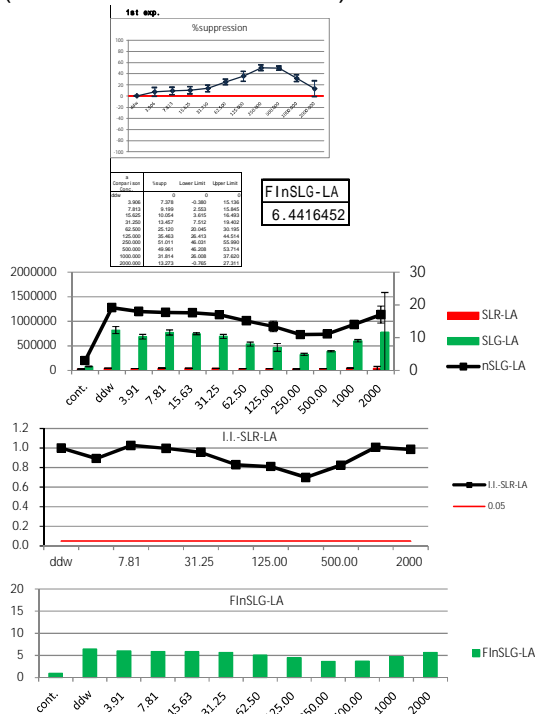


(FDSC)



Diethanolamine

(Lead Lab.: Tohoku Univ.)



(FDSC)

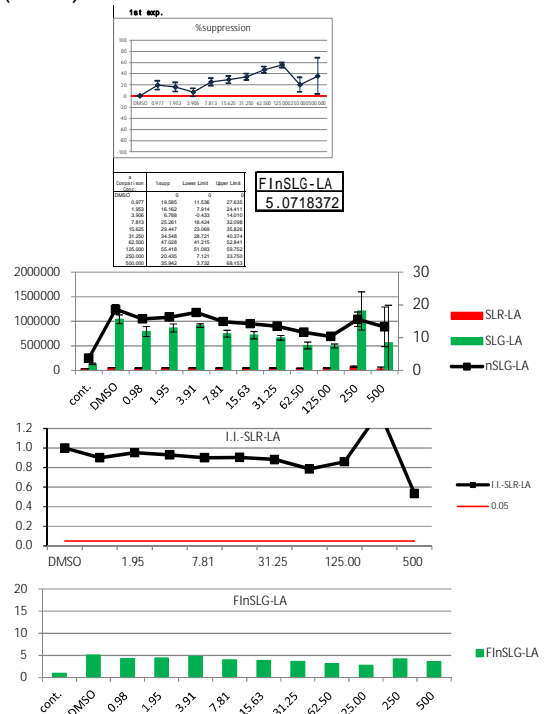
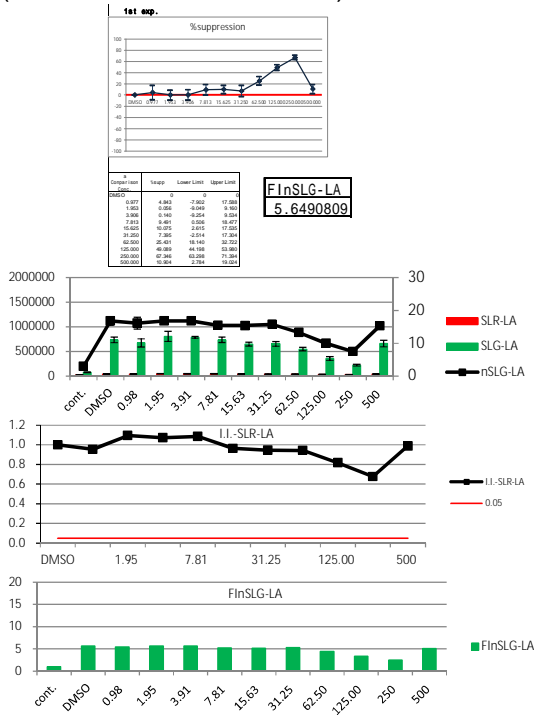


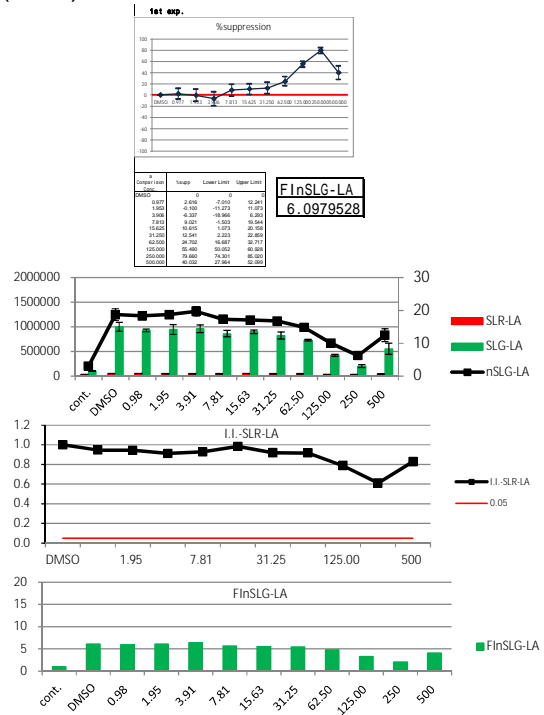
図9 リードラボ (東北大学) による秦野研究所の技術確認試験結果

p-Nitroaniline

(Lead Lab.: Tohoku Univ.)

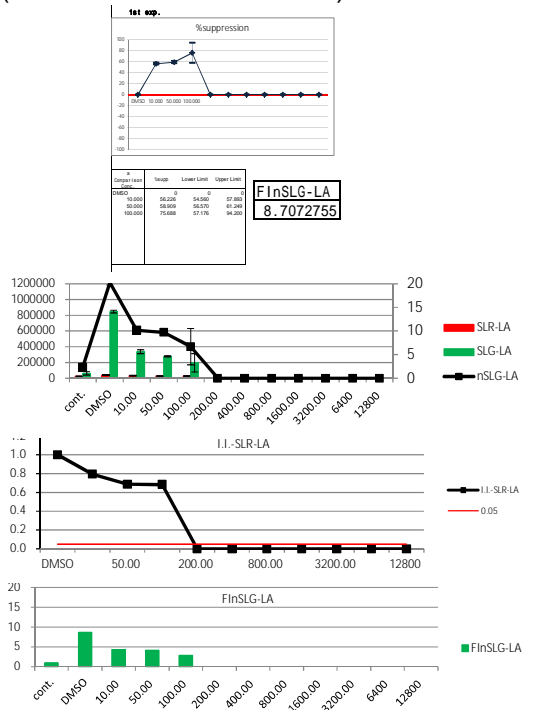


(FDSC)



Dexamethasone (Positive control)

(Lead Lab.: Tohoku Univ.)



(FDSC)

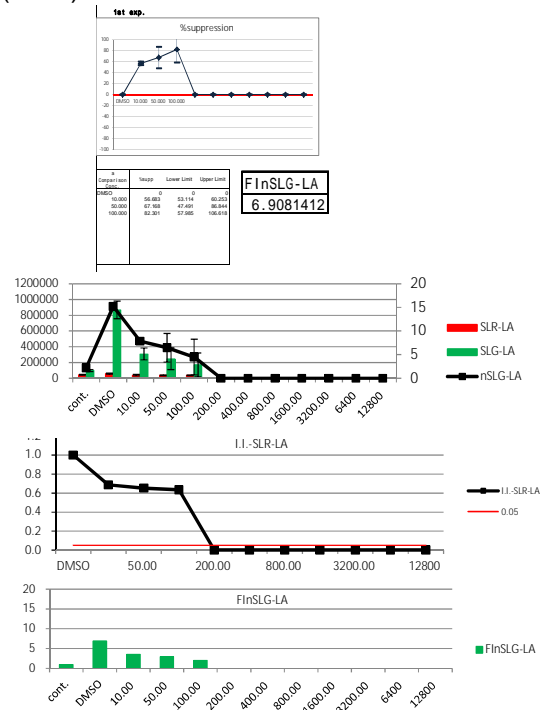
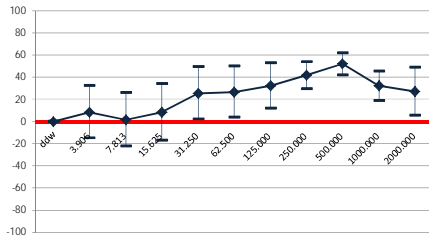
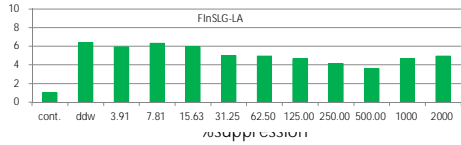
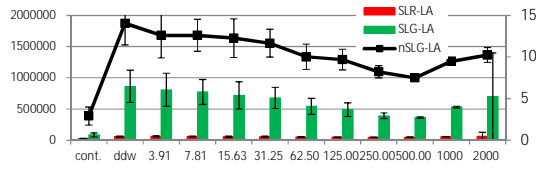


図9 リードラボ (東北大学) による秦野研究所の技術確認試験結果 (続き)

Retest

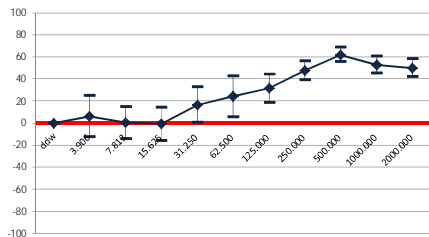
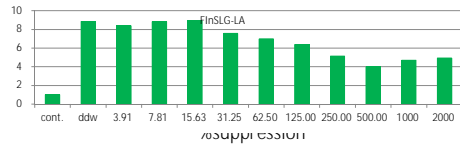
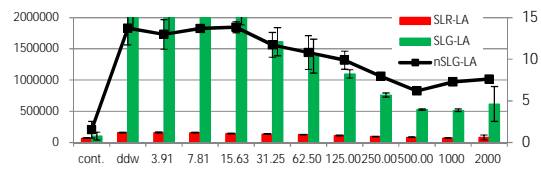
(1st Experiment)



a	Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
ddw		0	0	0
	3.906	8.537	-15.206	32.279
	7.813	1.781	-22.371	25.932
	15.625	8.165	-17.412	33.742
	31.250	25.596	2.163	49.029
	62.500	26.670	3.767	49.573
	125.000	32.189	11.559	52.819
	250.000	41.640	29.322	53.958
	500.000	51.853	41.808	61.897
	1000.000	32.038	18.752	45.324
	2000.000	27.105	5.553	48.658

FinSLG-LA
6.3935882

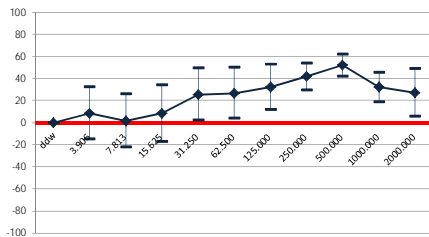
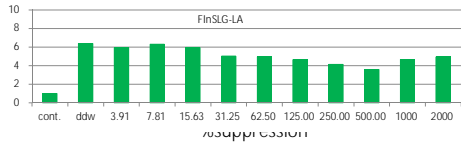
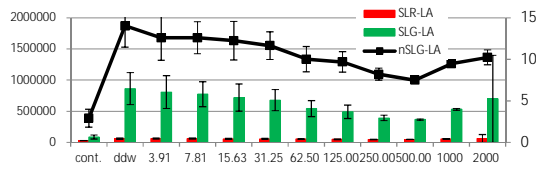
(2nd Experiment)



a	Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
ddw		0	0	0
	3.906	6.011	-12.539	24.580
	7.813	0.220	-14.311	14.751
	15.625	-1.008	-16.246	14.230
	31.250	16.425	0.192	32.657
	62.500	24.022	5.707	42.337
	125.000	31.406	18.484	44.327
	250.000	47.310	38.850	55.771
	500.000	61.836	55.294	68.388
	1000.000	52.787	45.050	60.524
	2000.000	50.069	41.692	58.446

FinSLG-LA
8.8610082

(3rd Experiment)



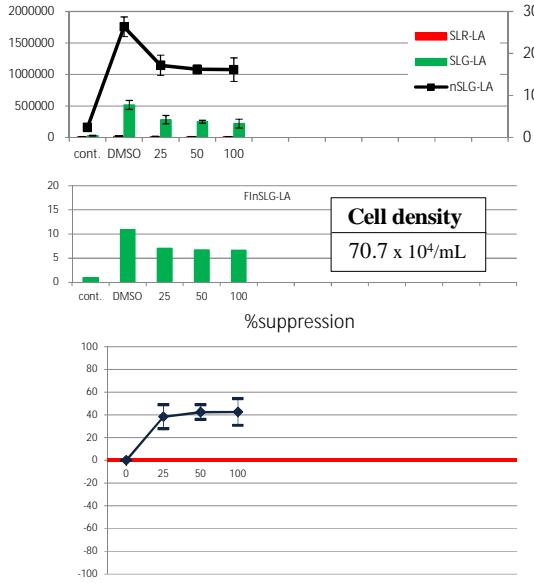
a	Comparison Conc.	%supp	Lower Limit	Upper Limit
ddw		0	0	0
	3.906	8.537	-15.206	32.279
	7.813	1.781	-22.371	25.932
	15.625	8.165	-17.412	33.742
	31.250	25.596	2.163	49.029
	62.500	26.670	3.767	49.573
	125.000	32.189	11.559	52.819
	250.000	41.640	29.322	53.958
	500.000	51.853	41.808	61.897
	1000.000	32.038	18.752	45.324
	2000.000	27.105	5.553	48.658

FinSLG-LA
6.3935882

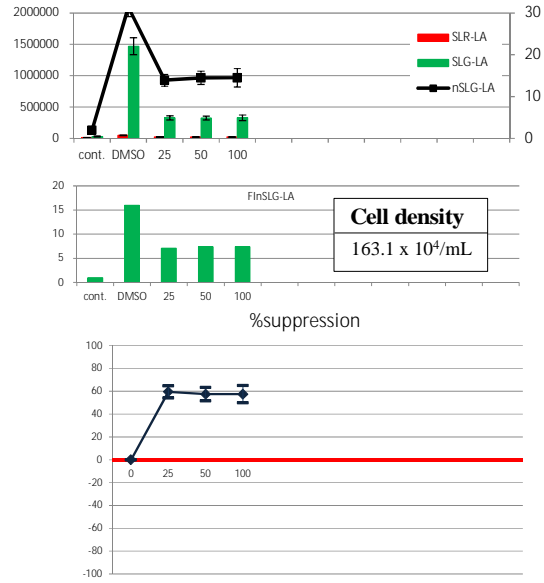
図 10 Diethanolamine の再実験結果

FDSC serum (Heat inactivated)

• Subculture at 2×10^5 cells/mL

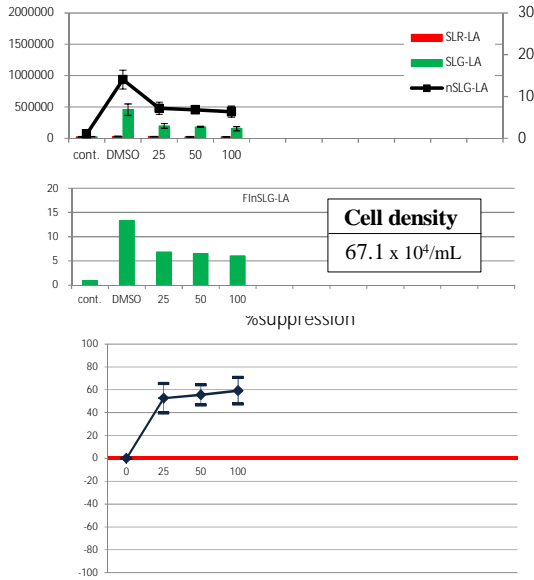


• Subculture at 5×10^5 cells/mL



Tohoku Univ. serum (Heat inactivated)

• Subculture at 2×10^5 cells/mL



• Subculture at 5×10^5 cells/mL

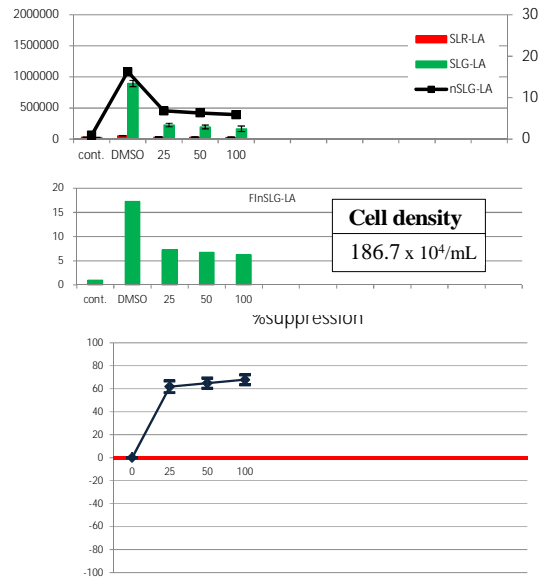
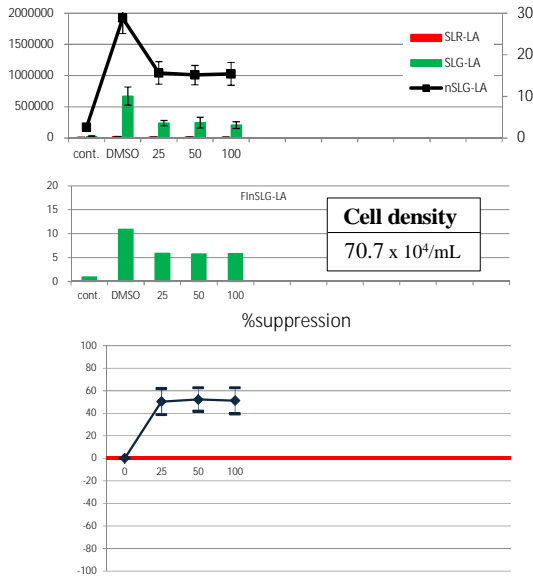


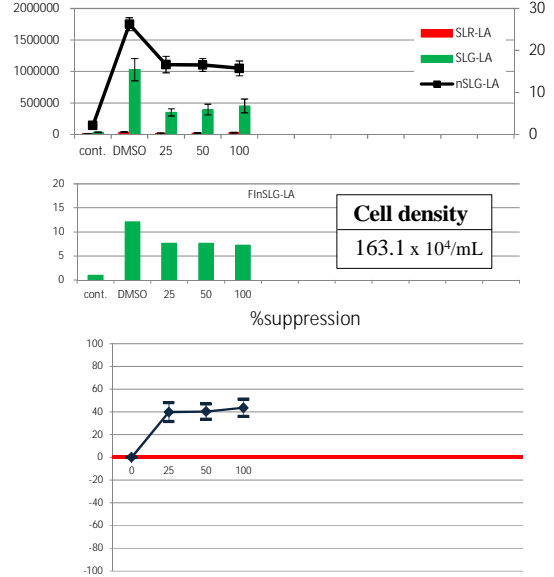
図 11 異なる FCS で継代後 3 日間培養した場合の IL-1 転写活性

3 Days after subculture

• Subculture at 2×10^5 cells/mL

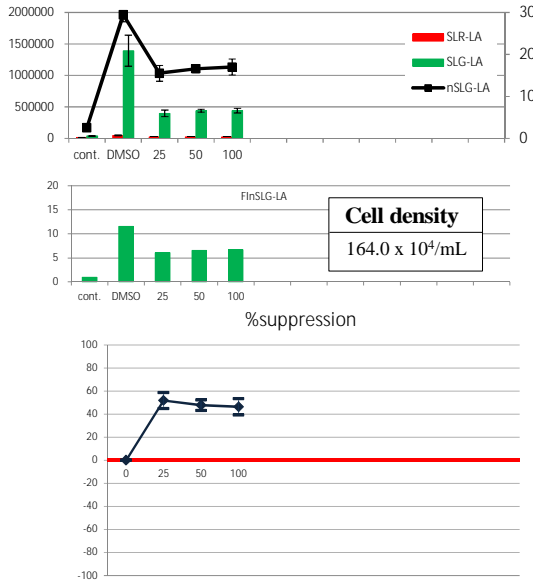


• Subculture at 5×10^5 cells/mL



4 Days after subculture

• Subculture at 2×10^5 cells/mL



• Subculture at 5×10^5 cells/mL

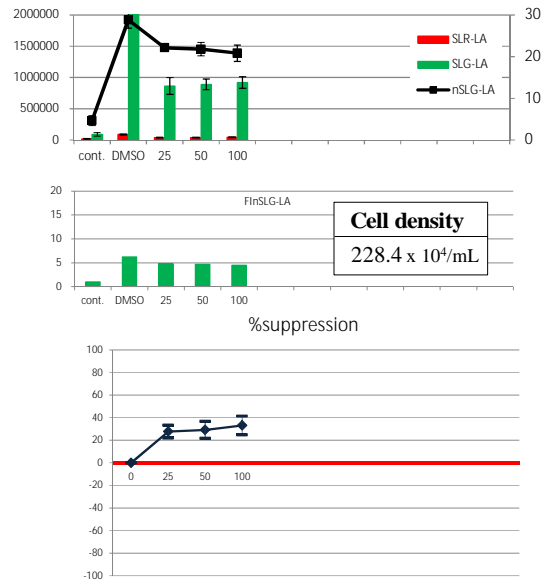
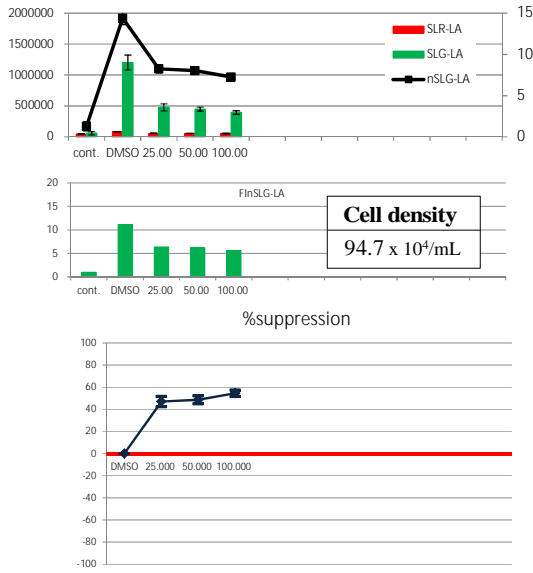


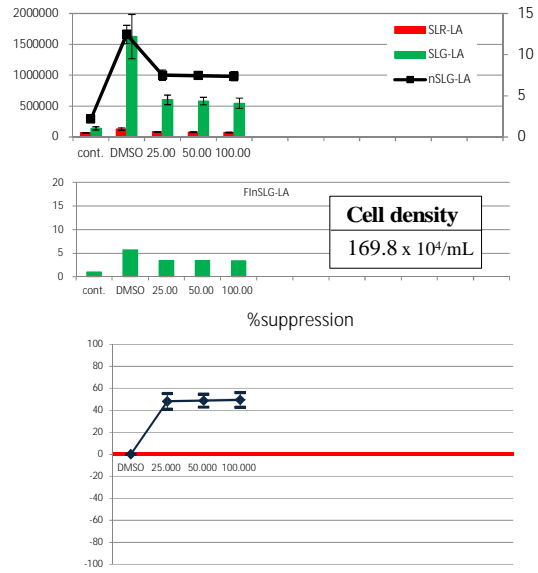
図 12 IL-1 転写活性に対する継代時の細胞密度と継代後の培養日数の影響

3 Days after subculture (Retest on the different day)

• Subculture at 20×10^4 cells/mL

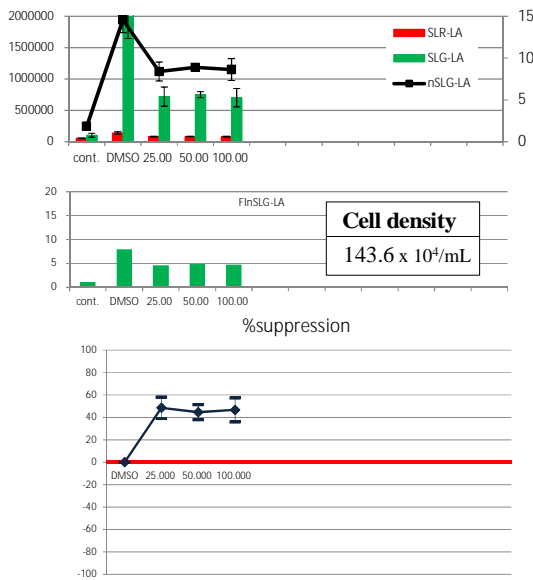


• Subculture at 50×10^4 cells/mL



4 Days after subculture (Retest on the different day)

• Subculture at 20×10^4 cells/mL



• Subculture at 50×10^4 cells/mL

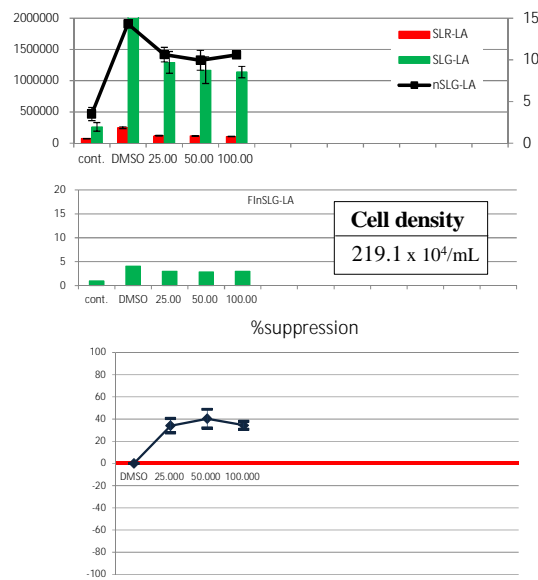


図 13 IL-1 転写活性に対する継代時の細胞密度と継代後の培養日数の影響 (再現性)

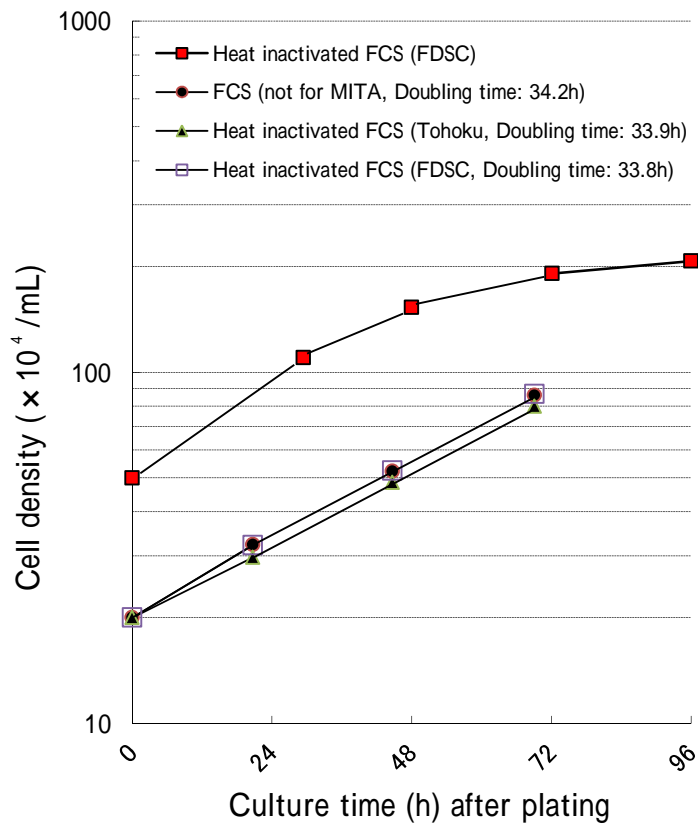


図 14 THP-G1b (TGCHAC-A4) 細胞の増殖曲線